

Evaluación de la seguridad de una arcilla modificada y su extracto de migración en bazo de ratas Wistar expuestas de forma subcrónica

Maisanaba S¹, Pichardo S¹, Jordá M², Aucejo S², Cameán A¹, Jos A^{1*}

¹Área de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. C/ Profesor García González nº 2, C.P. 41012, Sevilla, España. ²Área de Envases y Sistemas, Instituto Tecnológico de Envase, Transporte y Logística, ITENE. C/ Albert Einstein 1, C.P. 46980, Paterna, Valencia España.

Recibido 24 de septiembre de 2013 / Aceptado 16 de noviembre de 2013

Resumen: Las ventajas tecnológicas de la incorporación de arcillas modificadas en polímeros para el envasado de alimentos son bien conocidas, pero aún quedan muchas incertidumbres sobre la seguridad de estos materiales. El Instituto Tecnológico del Embalaje, Transporte y Logística ha desarrollado una arcilla, Clay1, modificando una montmorillonita con una sal de amonio cuaternario. Esta organoarcilla, incorporada al polímero (ácido poliláctico), da lugar a un material nanocompuesto, reforzándose así el material de partida. El principal objetivo de este estudio es evaluar la actividad de biomarcadores de estrés oxidativo en bazo de ratas expuestas durante 90 días a Clay1 (40 mg/kg/día) y al extracto de migración obtenido a partir del material nanocompuesto resultante. Los parámetros evaluados fueron la peroxidación lipídica y las actividades enzimáticas superóxido dismutasa y catalasa. Además, se realizó un análisis del contenido en bazo de los metales más característicos que componen la organoarcilla (Al, Ca, Fe, Mg, Si) para comprobar su posible acumulación. En dicho estudio se trabajó con tres grupos de ratas Wistar (n=10): control (comida estándar + agua como bebida), Clay1 (comida estándar mezclada con 40mg/kg/día de arcilla + agua) y extracto de Clay1 (comida estándar + extracto como bebida). Tras el tiempo de exposición los animales se sacrificaron y se extrajo el bazo. De forma general, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados con respecto al grupo control, por lo que Clay1 muestra un buen perfil toxicológico respecto a los biomarcadores ensayados con vistas a su uso en la industria alimentaria.

Palabras clave: arcilla modificada, envasado de alimentos, exposición subcrónica, estrés oxidativo

Abstract: Influence of a subchronical exposure to a modified clay and its migration extract in the spleen of Wistar rats. The technological advantages of the incorporation of modified clays into polymers for food packaging are well known. However, there are still many uncertainties about the safety of these materials. The Technological Institute of Packaging, Transport and Logistic has developed Clay1, a modified clay with a quaternary ammonium salt. This organoclay is incorporated into the polymer (polylactic acid), giving a nanocomposite material and reinforcing the bulk material. The aim of this study is to evaluate the activity of several oxidative stress biomarkers in the spleen of rats exposed for 90 days to Clay1 (40 mg/kg/day) and its migration extract obtained from the resultant nanocomposite material. The parameters evaluated were lipid peroxidation and superoxide dismutase and catalase activities. Moreover, the characteristic metallic components of the organoclay (Al, Ca, Fe, Mg, Si) were also analyzed to test the possible accumulation. In this study, three groups of Wistar rats (n=10) were

used: control (standard food + water), Clay1 (food with Clay1+water) and Clay1 extract (standard food+ Clay1 extract as water). After the exposure the spleen was removed. In general, no significant differences were observed in any of the parameters evaluated compared to the control group, therefore Clay1 showed a good toxicologic profile regarding the biomarkers assayed for its use in the food industry.

Keywords: modified clay, food packaging, subchronical exposure, oxidative stress

Introducción

El uso de arcillas naturales como la montmorillonita (MMT), kaolinita, bentonita, etc., está en auge en diversos campos de trabajo. Por ejemplo, podemos encontrarlas actuando como catalizadores, adsorbentes, en materiales nanocompuestos, en sensores y electrodos, como antibacterianos en determinados materiales, en almacenaje de desechos nucleares y transportadores de pesticidas, etc. [1]. El papel que juegan dentro de la industria alimentaria, y más concretamente en el área de envasado, es cada vez más destacado. El uso de plásticos en el envasado de alimentos está ampliamente instaurado dentro de la industria de la alimentación, pero se debe tener en cuenta que la calidad y seguridad de los alimentos envasados puede verse comprometida si existe la posibilidad de intercambio gaseoso, acuoso y/o de componentes aromáticos [2]. En este aspecto en particular, el uso de las arcillas anteriormente mencionadas cobra un papel importante. La modificación de la superficie de las arcillas minerales recibe una especial atención ya que da lugar a nuevas aplicaciones y a nuevos materiales, siendo destacable el desarrollo de nuevos polímeros nanocompuestos [3]. Las organoarcillas son los nanomateriales más usados en el comercio para preparar estos polímeros nanocompuestos [4]. Así mismo, el aspecto económico es también muy beneficioso, logrando con estos materiales una relación coste-precio-eficiencia notable [5,6].

Entre las arcillas que más destacan para dar lugar a los materiales nanocompuestos se encuentra la MMT sódica, comercialmente conocida como Cloisite®Na⁺ (C@Na⁺), un hidroxisilicato de magnesio y aluminio, con otros posibles elementos presentes. Tiene una estructura laminar, compuesta por dos láminas tetraédricas formadas por silicio (Si) y oxígeno (O) acoplada a una lámina octaédrica formada por átomos de magnesio (Mg) y aluminio (Al) unidos a O y grupos hidroxilo (OH) [7].

Una vez que la arcilla se imbuje y dispersa en el polímero seleccionado, sus láminas se disponen dando lugar a una estructura que obliga a los gases a seguir una trayectoria tortuosa, consiguiendo de tal forma que se disminuya la permeabilidad. La principal ventaja

*e-mail: angelesjos/us.es

del uso de estas arcillas como “relleno” es la mejora que se produce en las propiedades barrera del polímero [8]. Además, otros autores también destacan las mejoras en las propiedades mecánicas, térmicas, reológicas y ópticas de los materiales nanocompuestos [6,9], incrementándose así la vida comercial del producto.

Una de las limitaciones del uso de las arcillas como nano-rellenos es la incompatibilidad entre la hidrofilia de la arcilla y la hidrofobicidad del polímero, lo cual puede dar lugar a la aglomeración de la arcilla en la matriz polimérica [10,11]. Una apropiada modificación orgánica de la arcilla es la clave para una exitosa exfoliación en la matriz polimérica, reduciéndose la hidrofilia de la arcilla y mejorando la compatibilidad con la misma [12]. Finalmente, se obtiene un material nanocompuesto con una disposición de la arcilla en forma laminar con un grosor de las mismas de tamaño nanométrico, de ahí que reciban el nombre de nanoarcillas.

En el caso de la MMT, una de las modificaciones más usuales llevadas a cabo y de la cual se ha obtenido un buen resultado, es la modificación por intercambio iónico. El cambio de iones inorgánicos de la MMT con iones orgánicos de amonio, alcaliamonios, da lugar a unos silicatos laminares organomodificados más organizados que mejoran la compatibilidad de la MMT con polímeros orgánicos [7,13].

Debido al amplio espectro de aplicaciones que tienen estas arcillas organomodificadas, el consumidor cada vez va a estar más expuesto a ellas. Por ello, se hace necesaria una rigurosa evaluación de estos nuevos materiales que se incorporan al mercado, dilucidando qué posibles efectos tóxicos podría ocasionar en el ser humano y las consecuencias de los mismos. Hasta el momento, la intoxicación por arcillas minerales ha ocurrido con más frecuencia por vía inhalatoria [10,14]. Sin embargo, al estar presente estas arcillas en materiales de envasado, la vía de entrada más común en la actualidad es la oral, pudiendo presentarse migración de las mismas desde el material de envasado hasta el alimento. Tateo y Summa [15], han descrito que la ingestión de arcillas minerales es común a bajas dosis teniendo en cuenta la presencia de las mismas en los productos, no sólo alimenticios sino también farmacéuticos y hierbas medicinales.

La evaluación toxicológica de estos productos puede llevarse a cabo tanto *in vitro* con *in vivo*. En la literatura científica podemos encontrar diversos estudios realizados *in vitro* con arcillas modificadas y los efectos observados tras la exposición a las mismas. Sharma y col. [16], evaluaron el potencial genotóxico de la MMT sin modificar, C[®]Na⁺, así como el de la arcilla organomodificada Cloisite[®]30B (C[®]30B) en la línea celular intestinal humana Caco-2, concluyendo que la genotoxicidad observada podía deberse a la sal de amonio cuaternario usada como modificador de la arcilla. Por otro lado, también se ha evaluado la citotoxicidad producida por exposición de las células hepáticas HepG2 a C[®]Na⁺ y la arcilla modificada Cloisite[®]93A (C[®]93A), en las cuales se pudo observar un significativo descenso de la viabilidad celular [17]. En nuestro laboratorio, también se ha evaluado el potencial tóxico de arcillas modificadas en las líneas celulares mencionadas, observándose resultados diversos. Se sugiere por tanto que los modificadores empleados pueden estar involucrados en el perfil de toxicidad observado [18-21].

Por otro lado, los datos de ensayos *in vivo* realizados hasta el momento con este tipo de materiales aún son escasos, y, la información disponible no es representativa para la población humana, puesto que suelen ser ensayos a dosis repetidas en un periodo corto de tiempo. Por todo ello, el objetivo de este trabajo es

determinar la toxicidad oral subcrónica de una arcilla modificada desarrollada por el Instituto Tecnológico del Embalaje, Transporte y Logística (ITENE) destinada a ser incorporada a ácido poliláctico para ser utilizada en la industria de envasado, así como del extracto de migración derivado del material nanocompuesto resultante, empleando como modelo experimental la rata Wistar. Se evaluó, en bazo, el contenido proteico, la posible peroxidación lipídica (LPO), la actividad de dos enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), y un análisis de contenido de metales (Al, Fe, Mg, Si y Ca) que hayan podido acumularse debido a la ingestión de la arcilla.

Materiales y Métodos

Materiales y reactivos

Los reactivos de uso general fueron proporcionados por Sigma Aldrich (Madrid, España) y VWR International Eurolab (España).

La arcilla organomodificada designada como Clay1 fue obtenida mediante una reacción de intercambio catiónico a partir de C[®]Na⁺ (Southern Clay Products, INC.), añadiendo una sal de amonio cuaternario, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTA), en una proporción seis veces mayor a la capacidad de intercambio catiónico (CEC) de la arcilla madre, de acuerdo con el método descrito por Mittal [22], Jordá-Beneyto y col. [23] y Jordá y col. [7]. La arcilla fue caracterizada mediante espectroscopía de infrarrojos (FTIR), análisis termogravimétrico (TGA) y difracción de rayos X (XRD) por Jordá-Beneyto y col. [24].

El extracto de migración se obtuvo de acuerdo a lo descrito en Maisanaba y col. [25] siguiendo la norma UNE-EN 1186-9:2002 [26] y utilizando como simulante alimentario el agua, ya que es el menos tóxico de entre los autorizados por la legislación vigente. Posteriormente, este agua fue utilizada como agua de bebida para el ensayo *in vivo*.

Animales y diseño experimental

Se realizó un estudio de toxicidad oral durante 90 días en ratas. Se usaron 30 ratas Wistar macho, con un peso medio de 240±2, proporcionadas por Janvier S.A.S (Francia). Las ratas fueron tratadas durante la semana de aclimatación con una alimentación estándar de laboratorio (Harlan 2014, Harlan Laboratories, Barcelona, España) y agua, ambos *ad libitum*, en una habitación con control de temperatura (23±1°C), con periodos de 12h de luz y 12h de oscuridad y libres de cualquier fuente de contaminación química. Posteriormente, los animales se dividieron en tres grupos, el grupo control (n=10), grupo expuesto a Clay1 (n=10) y grupo expuesto al extracto de Clay1 (n=10). El grupo control fue alimentado con dieta estándar y agua, al grupo expuesto a Clay1 se le administró una dosis de 40 mg/kg/día de la arcilla en la comida y, como bebida agua, y al grupo expuesto al extracto de Clay1 se le expuso a la dieta estándar y al extracto de migración como bebida. La dosis de arcilla fue seleccionada teniendo en cuenta el peor escenario de exposición para el ser humano. El consumo de comida y agua fue *ad libitum* en los tres grupos, registrándose éstos semanalmente, así como el incremento de peso de los animales.

Los animales fueron manipulados teniendo en cuenta las directrices establecidas para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos [27]. Así mismo, todos los procedimientos fueron aceptados previamente por el Comité Ético de la Universidad de Sevilla.

Extracción del bazo y preparación del sobrenadante postmitocondrial

Transcurridos los 90 días de exposición, las ratas se sometieron a un ayuno de 18h antes del sacrificio. El estudio se realizó en bazo por ser éste un órgano muy proclive a la acumulación de partículas [28] y por tanto podría ser una diana para este tipo de compuestos. Los órganos fueron lavados en frío con solución salina y posteriormente se pesaron. Las muestras se mantuvieron congeladas a -80°C hasta el análisis de los diferentes parámetros. Para el estudio de los biomarcadores de estrés oxidativo, el tejido se homogenizó usando un tampón compuesto por KH_2PO_4 50mM, $\text{Na}_4\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1mM y albúmina de suero bovino (BSA). Realizada la homogenización se procedió a la centrifugación de las muestras ($2500 \times g$ durante 20min), eliminación del sobrenadante y recogida del homogenizado limpio en alícuotas de 2 mL.

Contenido proteico y LPO

El contenido proteico de las muestras de bazo fue determinado mediante el protocolo descrito por Bradford [29], usando como estándar la γ -globulina. Los resultados fueron expresados como mg proteína/g de tejido.

La LPO se cuantificó mediante el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) [30]. Los valores fueron representados como nmoles de TBARS/g de tejido.

Enzimas antioxidantes

La actividad total de la SOD (EC 1.15.1.1) se determinó por el método de McCord y Fridovich [31]. Este ensayo depende de la capacidad de la SOD para inhibir la reducción del citocromo C mediada por el O_2 generado por el sistema de la xantina oxidasa. La actividad de la enzima fue medida a espectrofotométricamente a 505 nm. Los valores fueron representados como nkat/mg de proteínas. La actividad CAT (EC 1.11.1.6) fue calculada mediante el método de Beers y Sizer [32]. La reducción del peróxido de hidrógeno se mide espectrofotométricamente a 240 nm, usando cubetas de cuarzo de 1 mL con paso de luz de 1cm. Los resultados fueron expresados como nkat/mg de proteínas.

Análisis de metales

La presencia de Al, Fe y Mg en bazo fue determinada mediante espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) (Agilent 7500C, Agilent ICP-MS Systems, USA) utilizando los siguientes isótopos: Mg-24, Al-27 y Fe-56 (con celda de reacción octupolar presurizada con hidrógeno para eliminar la interferencia del ArO sobre el Fe-56). En el caso del Si y Ca, ambos fueron determinados mediante espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES, Horiba Jobin Yvon, modelo última 2) empleando líneas de emisión 251.611 nm y 317.933 nm para Si y Ca, respectivamente. Estas determinaciones se llevaron a cabo en el Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS) en base a protocolos normalizados de trabajo realizando previamente una digestión del tejido con HNO_3 al 65%. Los datos se expresan como mg de metal/g de tejido.

Análisis estadístico

Los resultados se muestran como la media \pm DE de diez animales por grupo. El análisis estadístico llevado a cabo fue el análisis de la varianza (ANOVA) usando el software GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA).

Resultados

Durante el periodo experimental no se produjo la muerte de ningún animal, siendo la evolución de los pesos y consumos normal. De igual forma, no se observaron efectos clínicos significativos.

Efectos sobre contenido proteico y LPO

El contenido proteico de los tres grupos experimentales, control, Clay1 y extracto de Clay1, fue muy similar (Fig. 1). La concentración proteica media resultó ser $32,5 \pm 3$ mg de proteína/ g de tejido, no presentándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

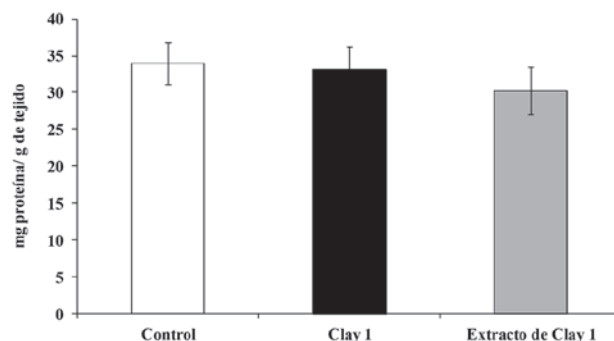


Figura 1. Contenido proteico (mg proteínas/mg tejido) de bazo de ratas control, ratas expuestas a 40 mg Clay1/kg rata/día y ratas expuestas a extracto de migración de Clay1 durante 90 días. Los valores están representados como la media \pm DE (n=10).

Los resultados obtenidos en LPO reflejaron que no hubo cambios significativos en ninguno de los grupos de exposición, Clay1 y extracto de Clay1, con respecto al grupo control (Fig. 2). En el grupo control fue obtenido un valor medio de 720 ± 172 nmoles de TBARS/g de tejido. En el caso de los grupos tratados Clay1 y extracto de Clay1 fueron 712 ± 164 y 676 ± 69 nmoles de TBARS/g de tejido, respectivamente.

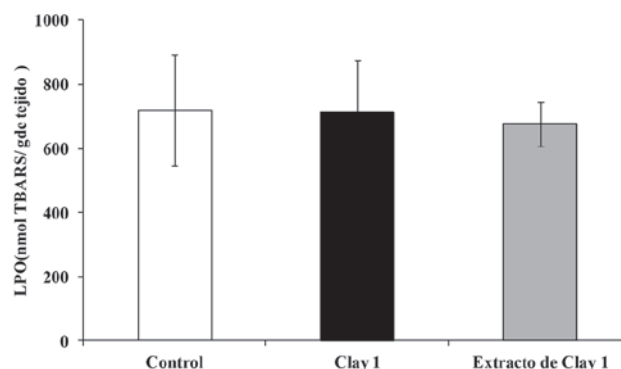


Figura 2. Valores de LPO en bazo de ratas control, ratas expuestas a 40 mg Clay1/kg rata/día y ratas expuestas al extracto de migración de Clay1 durante 90 días. Los valores están representados como la media \pm DE (n=10).

Efectos sobre enzimas antioxidantes

La actividad SOD no se alteró tras la exposición a 40 mg/kg/día de Clay1 tras el periodo de exposición, no observándose diferencias significativas con respecto el grupo control (Fig. 3a). Del mismo modo, los valores obtenidos en el caso del grupo expuesto al extracto de Clay1 fueron similares a los obtenidos en el grupo control. Los valores medios por grupo fueron: 133 ± 26 , 141 ± 35 y 122 ± 15 nkat/mg

de proteínas para el grupo control, Clay1 y extracto de Clay1, respectivamente.

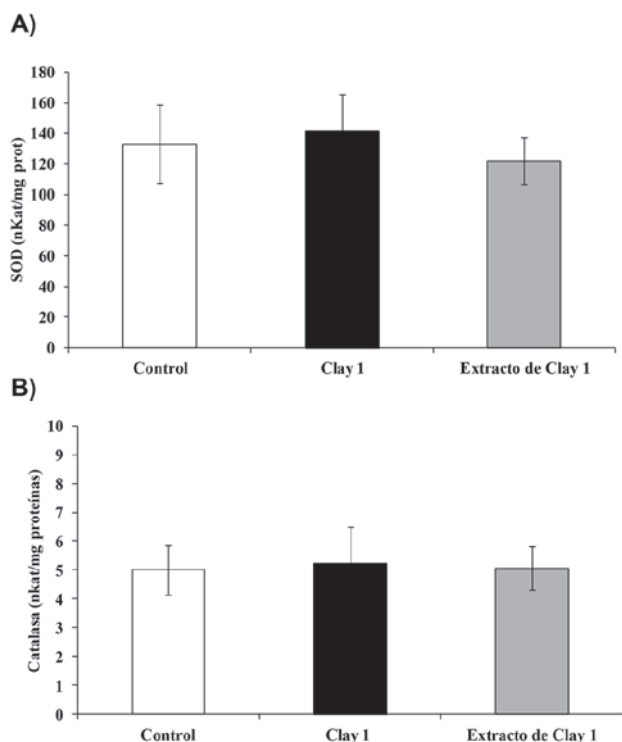


Figura 3. Actividad enzimática de SOD (Fig.3A) y CAT (Fig.3B) (nkat/mg proteína) en bazo de ratas control, ratas expuestas a 40 mg Clay1/kg rata/día y ratas expuestas al extracto de migración de Clay1 durante 90 días. Los valores están representados como la media \pm DE (n=10).

En el caso de CAT, se obtuvieron resultados similares en los tres grupos (Fig. 3B), no afectando a la actividad de la enzima la exposición a la arcilla modificada o al extracto de migración. Las actividades medias de la enzima en los grupos experimentales, control, Clay1 y extracto de Clay1, fueron $5 \pm 0,8$, $5,2 \pm 1,2$ y $5 \pm 0,7$ nkat/mg de proteínas, respectivamente.

Determinación de metales en bazo

En la tabla 1 se recogen los datos obtenidos en el análisis del contenido de metales en el bazo. En ningún caso se observaron cambios significativos tras 90 días de exposición.

Tabla 1. Contenido de Al, Ca, Fe, Mg y Si (mg metal/g tejido) en bazo de ratas control, ratas expuestas a 40 mg Clay1/kg rata/día y ratas expuestas a extracto de migración de Clay1 durante 90 días. Los valores están representados como la media \pm DE (n=10).

Grupos Experimentales	Media \pm DE (mg/g)				
	Al	Ca	Fe	Mg	Si
Control	0,215 \pm 0,089	0,198 \pm 0,089	1,536 \pm 0,230	0,153 \pm 0,012	0,011 \pm 0,004
Clay 1	0,138 \pm 0,057	0,132 \pm 0,087	1,640 \pm 0,699	0,153 \pm 0,011	0,009 \pm 0,007
Extracto de Clay 1	0,170 \pm 0,078	0,147 \pm 0,049	1,787 \pm 0,327	0,133 \pm 0,019	0,008 \pm 0,005

Discusión

El uso de arcillas minerales en diferentes aplicaciones industriales, y más concretamente en la industria alimentaria, está en auge debido a los buenos resultados técnicos obtenidos. Por tanto, la exposición a la

mismas se ve aumentada pudiéndose ver comprometida la seguridad del ser humano. La arcilla modificada Clay1 ha sido desarrollada con el fin de reforzar envases alimentarios, y es considerada por tanto como material de contacto alimentario [24]. La exposición del consumidor a compuestos químicos presentes en el material de envasado de alimentos podría ocurrir debido a la migración de los mismos desde el envase [33]. Tanto la migración como la toxicidad de una determinada sustancia se convierten en los dos factores principales que podrían definir el riesgo para el consumidor expuesto a estos nuevos materiales incorporados a los envases [34]. En relación a su toxicidad, se han realizado ensayos *in vitro* con Clay1 en la línea celular intestinal humana Caco-2 y en la línea hepática HepG2 [18,19]. Los resultados obtenidos mostraron una muy baja toxicidad en el rango de concentraciones ensayadas (0-8 μ g/mL). Únicamente en uno de los biomarcadores (contenido proteico total) y en la línea celular Caco-2 tras 48h de exposición a la concentración más alta se obtuvieron diferencias significativas. Concentraciones superiores no pudieron ensayarse debido a la hidrofobicidad de la arcilla.

Según la Comisión Europea [35], para que una sustancia que va a entrar en contacto con alimentos se comercialice, ésta debe pasar antes por una serie de evaluaciones, entre la que se encuentra una evaluación toxicológica precisa que recoge ensayos de diversa índole. Entre estos ensayos debe realizarse un estudio de toxicidad oral de 90 días. En el presente estudio, los resultados obtenidos, teniendo en cuenta que se ha trabajado con el peor escenario de exposición (migración total de la arcilla), no han mostrado efectos tóxicos notables en las ratas. Otros autores también han llevado a cabo estudios *in vivo* por vía oral con arcillas, aunque usando periodos de exposición más cortos. Li y col. [36] llevaron a cabo un ensayo de toxicidad oral en ratas, a las cuales se les expuso por una única vez a 4 dosis diferentes de una arcilla proveniente de MMT, sin encontrar finalmente efectos adversos tras 14 días desde la administración. Por otro lado, resultados similares fueron obtenidos por Baek y col. [37] después de realizar un ensayo de toxicidad oral aguda en ratones expuestos a MMT. No obstante, considerando la aplicación de estas arcillas en el envasado de alimentos el escenario de exposición más realista se correspondería con una ingesta de dosis bajas y repetidas en el tiempo como el empleado en el presente estudio.

Los resultados observados en el presente estudio, son consecuentes con los obtenidos previamente por nuestro equipo de investigación tras realizar en los mismos grupos experimentales un análisis de la bioquímica clínica del suero, interleukina-6 (IL-6) como marcador inflamatorio y contenido en glutatión reducido y oxidado (GSH/GSSG). En ningún caso se observaron diferencias significativas con respecto al grupo control en las determinaciones llevadas a cabo [38]. De forma similar en hígado y riñón tampoco se encontraron cambios en los tres biomarcadores considerados [39,40]. Esta ausencia de efectos adversos contrasta con los resultados obtenidos con ensayos *in vitro* con la MMT y/o arcillas organomodificadas derivadas de ella por otros autores [18-21,25]. En los mismos cabe destacar la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y por tanto producción de estrés oxidativo por exposición de dichas arcillas a las diferentes líneas celulares. Sin embargo, los estudios anteriores fueron llevados a cabo con arcillas diferentes a Clay1, pudiendo intervenir en el perfil de toxicidad de la arcilla el modificador empleado.

Meibian y col. [41] expusieron la línea celular humana de linfoblastos B (HMY2, CIR), a otras arcillas diferentes a la MMT, dos tipos de bentonitas (BP), activa y no activa, además de partículas de cuarzo y

yeso. Estos autores evaluaron *in vitro* la actividad de SOD y la producción de ácido malondialdehído (MDA) por exposición a estos materiales, observando una inhibición de la enzima antioxidante tras la exposición de las bentonitas y no tras la exposición a las otras partículas, e incluso presentándose una mayor inhibición por exposición de la BP activa. En el caso de la producción de MDA ocurre algo similar a lo anterior, produciéndose de forma muy significativa un aumento de la LPO en la línea celular tras la exposición de ambas bentonitas. En este caso, la modificación de la bentonita activa no estaría involucrada en el perfil de toxicidad presentado.

En cuanto a la presencia de metales en órganos como consecuencia de la exposición a arcillas, varios autores han realizado diferentes estudios. Mascolo y col. [42] llevaron a cabo un ensayo *in vivo* de toxicidad oral aguda centrado en la ingestión y distribución de elementos químicos presentes en distintas arcillas, ya que el organismo puede absorber dichos elementos procedentes de las mismas. Estos autores expusieron a los animales a una dosis de 450 mg/kg de arcilla, sacrificándolos a los tres días. No se observaron efectos tóxicos notables en las ratas aunque sí un incremento de las concentraciones de los elementos traza en determinados órganos. Finalmente los autores concluyeron que la exposición a arcillas podría derivar en serios problemas de salud por el incremento en el contenido metálico observado en los órganos.

Nuestro estudio llevado a cabo en bazo de ratas Wistar expuestas a 40 mg/kg/día de Clay1 y a su extracto de migración durante 90 días no dio lugar a ninguna alteración en los parámetros estudiados, ni a un incremento del contenido metálico en los grupos experimentales, pudiendo concluir que la arcilla modificada podría no comprometer la seguridad del consumidor en un futuro si ésta se comercializara.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2010-21210) y a la Junta de Andalucía (AGR5969) por la financiación de este estudio y la concesión de una beca predoctoral asociada a este último. También, agradecer al Servicio de Radioisótopos y Microanálisis del CITIUS por el análisis de metales en bazo.

Bibliografía

- Liu P (2007) Polymer modified clay minerals: A review. *Appl Clay Sci* 38: 64–76.
- Farhang B (2009) Chapter 22: Nanotechnology and applications in Food Safety. En: Barbosa-Cánovas G, Mortimer A, Lineback D, Spiess W, Buckle K, Colonna P. *IUFoST World Congress Book: Global Issues in Food Science and Technology*. 401-410.
- Betega de Paiva L, Morales AR, Valenzuela Díaz FR (2008) Organoclays: properties, preparation and applications. *Appl Clay Sci* 42: 8-24.
- Markarian J (2005) Automotive and packaging offer growth opportunities for nanocomposites. *Plast Addit Compound* 18-25.
- Sorrentino A, Gorrasi G, Vittoria V (2007) Potential perspectives of bionanocomposites for food packaging applications. *Trends Food Sci Tech* 18(2): 84-95.
- Hatzigrigoriou NB, Papaspyrides CD (2011) Nanotechnology in plastic food-contact materials. *J Appl Polym Sci* 122: 3720-3739.
- Jordá-Beneyto M, Alonso J, Salas M, Gallur M, Aucejo S, Clegg F, Breen C (2008) Processed biopolymer films filled with modified montmorillonite for food packaging applications. *Proc. of the Polymer Processing Society 24th Annual Meeting- PPS-24*: 15-19.
- Silvestre C, Duraccio D, Cimmino S (2011) Food packaging based on polymer nanomaterials. *Prog Polym Sci* 36: 1766-1782.
- De Azeredo HMC (2009) Nanocomposites for food packaging applications. *Food Res Int* 42: 1240-1253.
- Elmore AR, Andersen FA (2003) Final report on the safety assessment of aluminum silicate, calcium silicate, magnesium aluminum silicate, magnesium silicate, magnesium trisilicate, sodium magnesium silicate, zirconium silicate, attapugite, bentonite, fuller's earth, hectorite, kaolin, lithium magnesium silicate, lithium magnesium sodium silicate, montmorillonite, pyrophyllite, and zeolite. *Int J Toxicol* 22: 37-102.
- Zeng QH, Yu AB, Lu GQ, Paul DR (2005) Clay-based polymer nanocomposites: research and commercial development. *J Nanosci Nanotechnol* 5: 1574-1592.
- Paiva LB, Morales AR, Díaz FRV (2008) Organoclays: properties, preparation and applications. *Appl Clay Sci* 42: 8-24.
- Paul MA, Alexandre M, Degée P, Henrist C, Rulmont A, Dubois P (2003) New nanocomposite materials based on plasticized poly(L-lactide) and organomodified montmorillonites: thermal and morphological study. *Polymer* 44(2): 443-450.
- Carretero MI, Gomes CSF, Tateo F (2006) Clays and human health. En: Bergaya F, Theng BKG, Lagaly G (Eds.) *Handbook of Clay Science*, Elsevier, Amsterdam. pp. 717-742.
- Tateo F, Summa V (2007) Element mobility in clays for healing use. *Appl Clay Sci* 36: 64-76.
- Sharma AK, Schmidt B, Frandsen H, Jacobsen NR, Larsen EH, Binderup ML (2010) Genotoxicity of unmodified and organomodified montmorillonite. *Mutat Res* 700: 18-25.
- Lordan S, Kennedy JE, Higginbotham CL (2011) Cytotoxic effects induced by unmodified and organically modified nanoclays in the human hepatic HepG2 cell line. *J Appl Toxicol* 31: 27-35.
- Houtman J, Maisanaba S, Puerto M, Gutiérrez-Praena D, Jordá M, Aucejo S, Jos A (2014) Toxicity assessment of organomodified clays used in food contact materials on human target cell lines. *Appl Clay Sci* 90: 150-158.
- Gutiérrez-Praena D, Pichardo S, Jordá M, Ortuño N, Aucejo S, Jos A (2012) Study of the cytotoxic effects of organomodified clays in the human cell line Caco-2. *European Society of Toxicology In Vitro*, Lisbon, Portugal.
- Maisanaba S, Puerto M, Pichardo S, Jordá M, Moreno FJ, Aucejo S, Jos A (2013) *In vitro* toxicological assessment of clays for their use in food packaging applications. *Food Chem Toxicol* 57: 266-275.
- Maisanaba S, Gutiérrez Praena D, Pichardo S, Moreno FJ, Jordá M, Cameán AM, Aucejo S, Jos A (2014) Toxic effects of modified montmorillonite clay on the human intestinal cell line Caco-2. *J Appl Toxicol* 34: 714-725.
- Mittal V (2007) Esterification reactions on the surface of layered

- silicate clay platelets. *J Colloid Interf Sci* 315(1): 135-141.
23. Jordá M, Alonso J, Gallur M, Devis A, Ortuño N, Aucejo S (2009) Organo modified montmorillonite for the preparation of biopolymer nanocomposites for food packaging applications. Eurofillers 2009 International Conference. Alessandria (Italia) Politecnich of Turin.
24. Jordá-Beneyto M, Ortuño N, Devis A, Aucejo S, Gutiérrez-Praena D, Houtman J, Pichardo S, Maisanaba S, Jos A (2014) Use of nanoclay platelets in food packaging materials: technical and cytotoxicity approach. *Food Addit Contam A* 31: 354-363.
25. Maisanaba S, Pichardo S, Jordá-Beneyto M, Aucejo S, Cameán AM, Jos A (2014) Cytotoxicity and mutagenicity studies on migration extracts from nanocomposites with potential use in food packaging. *Food Chem Toxicol* 66: 366-372.
26. AENOR (2002) Spanish Association for Standarisation and Certification. UNE-EN-1186-9:2002 "Materials and articles in contact with foodstuffs. Plastic. Part 9: Test methods for overall migration into aqueous food simulants by filling"
27. Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Publicado en el boletín Oficial del Estado del 8 de febrero de 2013. Pág 11370-11421. http://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-2013-1337
28. SCHENIR (2009) Risk Assessment of Products of Nanotechnologies. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risk.
29. Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
30. Esterbauer H, Cheeseman KH (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products malonaldehyde and 4-hydroxynonetal. *Methods Enzymol* 186: 407-421.
31. MCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
32. Beers RF, Sizer IW (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195: 133-140.
33. Guillard V, Mauricio- Iglesias M, Gontard N (2010) Effect of novel food processing methods on packaging: structure, composition, and migration properties. *Crit Rev Food Sci* 28(12): 1758-1762.
34. Pocas MF, Hogg T (2007) Exposure assessment of chemicals from packaging materials in food: a review. *Trends Food Sci Tech* 18: 219-230.
35. European Commission Health & Consumer protection Directorate-General (2001) Guidelines of the Scientific Committee on Food for the presentation of an application for safety assessment of a substance to be used in food contact materials prior to its authorization. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out82_en.pdf
36. Li PR, Wei JC, Chiu YF, Su HL, Peng FC, Lin JJ (2010) Evaluation on toxicity and genotoxicity of the exfoliated silicate nanoclay. *Appl Mat Interf* 2(6): 1608-1613.
37. Baek M, Lee JA, Choi SJ (2012) Toxicological effects of a cationic clay, montmorillonite *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell Toxicol* 8: 95-101.
38. Jos A, Maisanaba S, Puerto M, Gutiérrez-Praena D, Moyano R, Blanco A, Pichardo S, Jordá M, Aucejo S, Cameán AM (2013) Histological and biochemical study in rats subchronically exposed to an organomodified clay and its migration extract. 49th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX), Interlaken, Switzerland.
39. Maisanaba S, Puerto M, Gutiérrez-Praena D, Llana-Ruiz-Cabello M, Pichardo S, Mate A, Jordá-Beneyto M, Cameán AM, Aucejo S, Jos A (2014) *In vivo* evaluation of activities and expression of antioxidant enzymes in Wistar rats exposed for 90 days to a modified clay. *J Toxicol Env Heal A* 77:1-11.
40. Maisanaba S, Gutiérrez-Praena D, Puerto M, Llana-Ruiz-Cabello M, Pichardo S, Moyano R, Blanco A, Jordá-Beneyto M, Jos A (2014) *In vivo* toxicity evaluation of the migration extract of an organomodified clay-poly(lactic) acid nanocomposite *J Toxicol Env Heal A*. DOI:10.1080/15287394.2014.890987.
41. Meibian Z, Yezhen L, Xiaoxue L, Qing C, Longxi L, Mingluan X (2010) Studying the cytotoxicity and oxidative stress induced by two kinds of bentonite particles on human B lymphoblast cells *in vitro*. *Chem-Biol Interact* 183: 390-396.
42. Mascolo N, Summa V, Tateo F (2004) *In vivo* experimental data on the mobility of hazardous chemical elements from clays. *Appl Clay Sci* 25: 23-28.